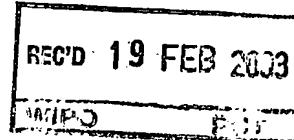


PCT/CN02/00942

## 证 明



本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2002 12 09

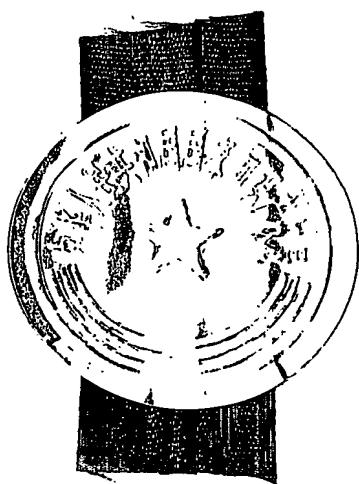
申 请 号： 02 1 53992.8

申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 从样品中分离细胞粒子的方法及其试剂盒

申 请 人： 清华大学；北京博奥生物芯片有限责任公司

发明人或设计人： 张旭； 谢欣； 陈德朴； 费维扬； 程京



**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

中华人民共和国  
国家知识产权局局长

王景川

2003 年 1 月 21 日

BEST AVAILABLE COPY

# 权利要求书

1. 一种用于从样品中分离靶细胞、细胞器或病毒的方法，该方法包括：
  - a) 将含有或可能含有靶细胞、细胞器或病毒的样品与磁性微珠接触，所述的磁性微珠不含有与所述的靶细胞、细胞器或病毒高特异性结合的部分；
  - b) 如果所述的靶细胞、细胞器或病毒存在于所述的样品中，使其与所述的磁性微珠非特异或低特异结合，在所述靶细胞、细胞器或病毒和所述的磁性微珠形成复合物；以及
  - c) 通过磁力使所述的复合物与其它不需要的成分分离，以从所述的样品中离析所述的靶细胞、细胞器或病毒。
2. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，其中所述的靶细胞选自动物细胞、植物细胞、真菌细胞、细菌细胞、重组细胞或培养细胞。
3. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，其中所述的靶细胞器选自核、线粒体、叶绿体、核糖体、ER（内质网）、高尔基器、溶酶体、蛋白酶体、分泌小体、液泡和微粒体。
4. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，其中所述的靶病毒是真核细胞病毒或噬菌体。
5. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，其中所述的磁性微珠包括选自顺磁物质、铁磁化物质和亚铁磁化物质的可磁化物质。
6. 根据权利要求 5 所述的方法，其特征在于，其中所述的可磁化物质包括金属组合物。
7. 根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于，其中所述的金属组合物是过渡金属组合物或其合金。
8. 根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于，其中所述的过渡金属选自铁、镍、铜、钴、锰、钽、锆和钽-钽-锆(CoTaZr)合金。

9. 根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于，其中所述的金属组合物是  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 。

10. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，其中所述的磁性微珠的直径为大约 5 至大约 50,000 纳米。

11. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，其中所述的磁性微珠是未处理或用有机分子改性的磁性微珠。

12. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，其中所述的磁性微珠是改性的含有羟基、羧基或环氧基的磁性微珠。

13. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，它进一步包括冲洗分离的复合物以去除不需要的成分。

14. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，它进一步包括从分离的复合物中回收靶细胞、细胞器或病毒。

15. 根据权利要求 14 所述的方法，其特征在于，其中所述的靶细胞、细胞器或病毒是用合适的缓冲液从分离的复合物中释放进缓冲液中，通过磁力使磁性微珠从溶液中去除。

16. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，其中所述的样品是临床样品。

17. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，其中所述的样品选自于从血清、血浆、全血、痰、脑脊液、羊水、尿液、胃肠道内容物、头发、唾液、汗液、牙龈刮除物、骨髓、组织和细胞培养液。

18. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，它进一步包括从分离的靶细胞、细胞器或病毒中回收所述的生物粒子。

19. 根据权利要求 18 所述的方法，其特征在于，其中所述的生物粒子选自氨基酸、

肽、蛋白质、核苷、核苷酸、寡核苷酸、核酸、维生素、单糖、寡糖、碳水化合物、脂质及其复合物。

6

20. 根据权利要求 19 所述的方法，其特征在于，该方法进一步包括扩增回收的寡核苷酸或核酸。

21. 根据权利要求 1 所述的方法，该方法是自动的。

22. 根据权利要求 1 所述的方法，该其特征在于，方法在大约 1 分钟至大约 20 分钟内完成。

23. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，该方法在离心管中操作。

24. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，该方法在无沉淀步骤下操作。

25. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，该方法在无毒性试剂下操作。

26. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，该方法在大约 0 至大约 35℃ 的室温下操作。

27. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，该方法用于从全血、骨髓或淋巴中分离淋巴细胞。

28. 根据权利要求 27 所述的方法，其特征在于，其中所述的全血、骨髓或淋巴是新鲜或低温保存的全血、骨髓或淋巴。

29. 根据权利要求 27 所述的方法，其特征在于，其中所述的淋巴细胞在具有以下特性的合适的化学环境中与磁性微珠接触：

- a) pH 范围为大约 3 至大约 7；和/或
- b) 合适的抗凝剂浓度。

30. 根据权利要求 29 所述的方法，其特征在于，其中所述的抗凝剂选自右旋糖枸

橼酸盐(ACD)、枸橼酸钠和肝素钠。

31. 根据权利要求 27 所述的方法，其特征在于，所述的方法进一步包括用冲洗缓冲液冲洗分离的淋巴细胞-磁性微珠以去除不需要的成分。

32. 根据权利要求 31 所述的方法，其特征在于，其中所述的冲洗缓冲液是 pH 值为大约 6.5 的生理盐水或 pH 值为大约 6.5 的磷酸盐缓冲液。

33. 根据权利要求 27 所述的方法，其特征在于，其中所述的淋巴细胞是用合适的分离缓冲液从分离的淋巴细胞-磁性微珠复合物中释放进缓冲液中，通过磁力使磁性微珠从溶液中去除。

34. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，其中所述的方法用于从唾液、尿液和组织培养物中分离靶细胞、细胞器或病毒。

35. 根据权利要求 34 所述的方法，其特征在于，其中所述的靶细胞是上皮脱落细胞或细菌细胞。

36. 根据权利要求 34 所述的方法，其特征在于，其中所述的唾液、尿液和组织培养物是新鲜或低温保存的唾液、尿液和组织培养物。

37. 根据权利要求 34 所述的方法，其特征在于，其中所述的靶细胞、细胞器或病毒是在 pH 范围为大约 3 至大约 7 的合适化学环境中与磁性微珠接触。

38. 根据权利要求 34 所述的方法，其特征在于，其中所述的方法进一步包括在靶细胞、细胞器或病毒和磁性微珠之间用冲洗缓冲液冲洗分离的复合物以去除不需要的成分。

39. 根据权利要求 38 所述的方法，其中所述的冲洗缓冲液是 pH 值为大约 6.5 的生理盐水或 pH 值为大约 6.5 的磷酸盐缓冲液。

40. 根据权利要求 34 所述的方法，其特征在于，其中所述的靶细胞、细胞器或

病毒是用合适的分离缓冲液从在靶细胞、细胞器或病毒和磁性微珠的分离复合物中释放进缓冲液中，通过磁力使磁性微珠从溶液中去除。

41. 根据权利要求 40 所述的方法，其中所述的分离缓冲液是 pH 为大约 6.5 至大约 8 的 Tris-EDTA 缓冲液和浓度大约为低于 1% (w/w) 的清洁剂。

42. 一种用于从样品中分离靶细胞、细胞器或病毒的试剂盒，在相同或不同的容器中该试剂盒包括：

- a) 用于接触含有或可能含有靶细胞、细胞器或病毒的样品的磁性微珠，所述的磁性微珠不含有与所述的靶细胞、细胞器或病毒高特异性结合的部分；
- b) 如果所述的靶细胞、细胞器或病毒存在于所述的样品中，用于使所述的靶细胞、细胞器或病毒与所述的磁性微珠非特异或低特异结合，在所述的靶细胞、细胞器或病毒和所述的磁性微珠形成复合物的装置；以及
- c) 用于通过磁力使所述的复合物与其它不需要的成分分离，以从所述的样品中分离所述的靶细胞、细胞器或病毒的装置。

43. 根据权利要求 42 所述的试剂盒，其特征在于，所述的试剂盒进一步包括使用所述的试剂盒从样品中分离靶细胞、细胞器或病毒的说明书。

44. 一种从样品中分离病毒或噬菌体的方法，该方法包括：

- a) 从含有或可能含有靶病毒或噬菌体的样品中去除细胞；
- b) 将所述的无细胞样品与磁性微珠接触，所述的磁性微珠不含有与所述的病毒或噬菌体高特异性结合的部分；
- c) 如果在所述的样品中存在所述的靶病毒或噬菌体，使其与所述的磁性微珠非特异或低特异结合，在所述的靶病毒或噬菌体和所述的磁性微珠形成复合物；以及
- d) 通过磁力使所述的复合物与其它不需要的成分分离，以从所述的样品中分离所述的靶病毒或噬菌体。

45. 根据权利要求 44 所述的方法，其特征在于，其中所述的样品是唾液、尿液或血浆。

46. 根据权利要求 45 所述的方法，其中所述的唾液、尿液或血浆是新鲜或低温保

存的唾液、尿液或血浆。

47. 根据权利要求 44 所述的方法，其中所述的病毒或噬菌体在以下物质存在下与磁性微珠接触：

- a) 足够浓度的可高度水合化合物，其浓度为大约 10% (v/v) 至大约 100% (v/v)；和/或
- b) 浓度为大约 2.5M 至大约 5.0M 的盐。

48. 根据权利要求 47 所述的方法，其中所述的高度可水合有机化合物选自乙醇、丙酮和聚乙二醇。

49. 根据权利要求 47 所述的方法，其中所述的盐是氯化钠。

50. 根据权利要求 45 所述的方法，其中所述的细胞是上皮脱落细胞或细菌细胞。

51. 根据权利要求 44 所述的方法，所述的方法进一步包括用冲洗缓冲液冲洗靶病毒或噬菌体和磁性微珠的分离复合物，以去除不需要的成分。

52. 根据权利要求 51 所述的方法，其中所述的冲洗缓冲液是 pH 值为大约 6.5 的生理盐水或 pH 值为大约 6.5 的磷酸盐缓冲液 (PBS)。

53. 根据权利要求 44 所述的方法，其中所述的靶病毒或噬菌体是用合适的分离缓冲液从分离的靶病毒或噬菌体和磁性微珠的复合物中释放进缓冲液中，通过磁力使磁性微珠从溶液中去除。

54. 根据权利要求 44 所述的方法，其中所述的细胞通过离心从样品中去除。

55. 一种用于从样品中分离靶病毒或噬菌体的试剂盒，在相同或不同的容器中该试剂盒包括：

- a) 用于从含有或可能含有靶病毒或噬菌体的样品中去除细胞的装置；
- b) 用于接触所述的无细胞样品的磁性微珠，所述的磁性微珠不含有与所述的靶细胞、细胞器或病毒高特异性结合的部分；

- c) 如果在所述的无细胞样品中存在所述的靶病毒或噬菌体，用于使所述的靶病毒或噬菌体与所述的磁性微珠非特异或低特异结合，在所述的靶病毒或噬菌体和所述的磁性微珠形成复合物的装置；以及
- d) 用于通过磁力使所述的复合物与其它不需要的成分分离，以从所述的样品中分离所述的靶病毒或噬菌体的装置。

# 说 明 书

## 从样品中分离细胞粒子的方法及其试剂盒

### 技术领域

本发明总的来说涉及生物粒子分离领域。具体而言，本发明提供了利用靶细胞、细胞器或病毒、噬菌体和磁性微珠之间的非特异或低特异性结合，从生物样品中分离靶细胞、细胞器或病毒、噬菌体等细胞粒子的方法和试剂盒。

### 背景技术

生物学发展水平依赖于细致、有效的生物样品的制备。从样品中分离含靶分子的生物粒子如细胞、病毒和噬菌体通常是限制技术发展速度的关键一步。传统的分离方法或者耗费时间或者包含昂贵的试剂或复杂的步骤如离心和色谱分析。因此，实现传统的分离方法的自动性、微型化和普遍性是很难的。

磁性微珠由于其顺磁性，可以通过磁场控制微珠-生物粒子的移动，以及经过表面修饰以后可以选择性与生物粒子结合，因此，它们广泛用于大量生物分子和细胞的分离。然而，目前使用磁性微珠的分离技术是基于抗体衍生的磁珠，不但昂贵并且需要严格的运输和保存条件。所以，这种抗体修饰的磁性微珠在日常的生物分离和实验室操作中受到局限。

### 发明内容

本发明的目的在于克服传统分离方法的问题和缺点，通过使用磁性微珠与核细胞的顺磁性、高分散性和附着性以及化学试剂的沉淀分离，提供一种非特异或低特异的从样品中分离靶细胞、细胞器或病毒等细胞粒子的方法。

本发明的另一目的在于提供一种从样品中分离靶细胞、细胞器或病毒等细胞粒子的试剂盒。

本发明涉及利用磁性微珠的非特异或低特异吸附和顺磁性作用，从多种来源如全血、唾液、血浆、骨髓、唾液、尿液和细胞和组织的培养液中分离包含靶生物分子（如核酸和蛋白）的靶细胞、细胞器或病毒（如淋巴细胞、病毒、上皮细胞和培养细胞）。在合适的缓冲液中，磁性微珠可以从生物样品中把这些靶细胞、细胞器或病毒分离出来。分离的细胞可以用于细胞培养、药物筛选、生物-化学反应和生物学分析。本发明涉及的简单快速的分离方法可以用于不同规模的样品制备，特别适用于小量和微量样品，并且能很容易的建立自动和微量装置。

一方面，本发明涉及用于从样品中分离靶细胞、细胞器或病毒的方法，该方法包括：a) 将含有或可能含有靶细胞、细胞器或病毒的样品与磁性微珠接触，所述

的磁性微珠不含有与所述的靶细胞、细胞器或病毒高特异性结合的部分；b) 如果所述的靶细胞、细胞器或病毒存在于所述的样品中，使其与所述的磁性微珠非特异或低特异结合，所述靶细胞、细胞器或病毒和所述的磁性微珠形成复合物；以及c) 通过磁力使所述的复合物与其它不需要的成分分离，从所述的样品中分离所述的靶细胞、细胞器或病毒。

另一方面，本发明涉及从样品中分离靶细胞、细胞器或病毒的试剂盒，在相同或不同的容器中该试剂盒包括：a) 用于接触含有或可能含有靶细胞、细胞器或病毒的样品的磁性微珠，所述的磁性微珠不含有与所述的靶细胞、细胞器或病毒高特异性结合的部分；b) 如果所述的靶细胞、细胞器或病毒存在于所述的样品中，用于使所述的靶细胞、细胞器或病毒与所述的磁性微珠发生非特异或低特异结合，所述的靶细胞、细胞器或病毒和所述的磁性微珠形成复合物的装置；以及c) 用于通过磁力使所述的复合物与其它不需要的成分分离，从所述的样品中离析所述的靶细胞、细胞器或病毒的装置。

另一方面，本发明涉及从样品中分离病毒或噬菌体的方法，该方法包括：a) 从含有或可能含有靶病毒或噬菌体的样品中去除细胞结构；b) 将所述的无细胞样品与磁性微珠接触，所述的磁性微珠不含有与所述的病毒或噬菌体高特异性结合的部分；c) 如果在所述的样品中存在所述的靶病毒或噬菌体，使其与所述的磁性微珠非特异或低特异结合，让所述的靶病毒或噬菌体和所述的磁性微珠形成复合物；以及d) 通过磁力使所述的复合物与其它不需要的成分分离，从所述的样品中离析所述的靶病毒或噬菌体。

另一方面，本发明涉及从样品中分离病毒或噬菌体的试剂盒，在相同或不同的容器中该试剂盒包括：a) 用于从含有或怀疑含有靶病毒或噬菌体的样品中去除细胞结构的装置；b) 用于接触所述的无细胞样品的磁性微珠，所述的磁性微珠不含有与所述的靶细胞、细胞器或病毒高特异性结合的部分；c) 如果在所述的无细胞样品中存在所述的靶病毒或噬菌体，用于使所述的靶病毒或噬菌体与所述的磁性微珠发生非特异或低特异结合，让所述的靶病毒或噬菌体和所述的磁性微珠形成复合物的装置；以及d) 用于通过磁力使所述的复合物与其它不需要的成分分离，从所述的样品中离析所述的靶病毒或噬菌体的装置。

#### 附图说明

图1描述了基于磁性的细胞分离的示例。A: 加入用于靶细胞的磁珠；B: 孵育悬液，使磁珠与靶细胞结合；C: 使用磁力使珠-靶物质复合物固定到试管的一端。去除上清液。D: 清洗和重悬分离的靶细胞。

图 2 说明 HLA-A 等位基因 (1,100 bp) 的 PCR 产物。阳性对照组是使用传统方法分离 DNA 的 PCR 产物。凝胶上样量为 3 $\mu$ l 样品。泳道: (M): DNA 标记梯度 (DL-2000, TaKaRa, Japan); (1): 阴性对照; (2): 阳性对照; (3, 4): 按照本发明方法使用从全血样品制备的模板的“微珠-PCR”产物; (5, 6): 按照本发明方法使用从唾液样品制备的模板的“微珠-PCR”产物; (7, 8): 加入 2  $\mu$ l 全血作为模板; 和 (9, 10) 加入 2  $\mu$ l 唾液作为模板。

### 具体实施方式

为了阐明本发明，而非限制本发明，本发明的详细描述分成以下部分。

#### A. 定义

除非另有限定，此处使用的所有技术和科学术语的意思与本发明所属领域普通技术人员通常理解的意思相同。这里指出的所有专利、申请文本、公开文本和其它出版在此引入以供参考。如果在该部分中列出的定义与在此引入以供参考的专利、申请文本、公开文本和其它出版中列出的定义相反或不一致，在该部分中列出的定义将代替在引入的参考文献中的定义。

在此所用，“一个”指“至少一个”或“一个或多个”。

在此所用，“特异性结合”指一种物质以依赖于特定分子结构的存在的方式与另一种物质的结合。例如，受体将选择性地与含有和配体结合位点互补的化学结构的配体结合。

在此所用，“特异性结合对”指任何物质或一类物质，它对配体有排除其它物质的特异性结合的亲和力。在一个实施方案中，特异性结合对包括与样品配体互相作用的特异性结合分析试剂，或样品以免疫化学方式对配体的结合能力。例如，在试剂和/或样品配体或样品对配体的结合能力之间将存在抗原-抗体或半抗原-抗体关系。另外，本领域将会很好的理解到，配体和结合体之间的结合相互作用是特异性结合分析的基础，包括激素、维生素、代谢物、药物试剂、和它们各自的受体和结合物质之间的结合相互作用（如参考 Langan 等（编著），Ligand Assay, pp. 211 et seq., Masson Publishing U.S.A. Inc., New York, 1981）。

在此所用，“所述的磁性微珠不含有与所述的靶细胞、细胞器或病毒高特异性结合的部分”意指在磁性微珠和靶细胞、细胞器或病毒之间没有特异结合。例如，在磁性微珠和靶细胞、细胞器或病毒之间的结合不通过互补生物分子之间的特异相互作用调节，如配体和受体、抗原和抗体、酶作用底物和酶、碳水化合物和植物凝聚素、以及互补的核酸等等。它还指磁性微珠不包括与靶细胞、细胞器或病毒可以形成特异结合对的部分。例如，在磁性微珠中不包括的部分是生物分子，如氨基酸、

肽、蛋白、核苷酸、寡核苷酸、核酸、维生素、单糖、寡糖、碳水化合物、脂质及其复合物。优选在磁性微珠中不包括的部分是与靶细胞、细胞器或病毒特异结合的抗体。

在此所用，“如果靶细胞、细胞器或病毒存在于所述的样品中，使其与所述的磁性微珠非特异或低特异结合”与“所述的磁性微珠不含有与所述的靶细胞、细胞器或病毒高特异性结合的部分”具有相同的意思，即在磁性微珠和靶细胞、细胞器或病毒之间没有特异结合，在磁性微珠和靶细胞、细胞器或病毒之间的结合不通过互补生物分子之间的特异相互作用调节，并且磁性微珠不包括与靶细胞、细胞器或病毒可以形成特异结合对的部分。

在此所用，“抗体”指免疫球蛋白的特定类型，即 IgA、IgD、IgE、IgG 如 IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub> 和 IgG<sub>4</sub>，以及 IgM。抗体可以以任何合适的形式存在，而且可以含有任何合适的片断或衍生物。代表性的抗体包括多克隆抗体、单克隆抗体、Fab 片断、Fab' 片断、F(ab')<sub>2</sub> 片断、Fv 片断、微型双功能抗体、单链抗体和由抗体片断形成的多特异性抗体。

在此所用，“植物”指植物界的各种光合作用的、真核的多细胞生物体中的任一种，其特征在于可以产生胚胎、含有叶绿体、有纤维素细胞壁且缺乏运动能力。

在此所用，“动物”指动物界的多细胞生物体，其特征在于具有运动能力、非光合作用新陈代谢、对刺激有明确反应、生长受限且具有固定的身体结构。这些动物的非限定性实例包括鸟类如小鸡，脊椎动物如鱼，哺乳动物如小鼠、大鼠、野兔、猫、狗、猪、奶牛、公牛、绵羊、山羊、马、猴子和其它非人类灵长类。

在此所用，“细菌”指具有非区室化的环状 DNA 和大约 70S 的核糖体的小原核生物体（线尺寸大约 1 微米）。细菌蛋白质合成与真核细胞的合成不同。许多抗细菌抗生素干扰细菌蛋白质合成，但不影响被感染宿主的蛋白质合成。

在此所用，“真细菌”指除古细菌之外的细菌中的一个主要亚门。大部分革兰氏阳性细菌、蓝细菌、支原体、肠细菌、假单胞菌和叶绿体是真细菌类。真细菌的细胞质膜含有酯联脂类；在细胞壁（如果存在）中存在肽聚糖；并且未在真细菌内发现内含子。

在此所用，“古细菌”是指除真细菌之外的细菌中的一个主要亚门。古细菌有三种主要的目：极端嗜盐古菌、产甲烷古菌、超嗜热的元素硫代谢古菌。古细菌在核糖体结构、具有内含子（在某些情况下）和其它包括膜组成的特征上与真细菌不同。

在此所用，“真菌”指真核生物体中的一类，它们的生长形式是不规则团块，

没有根、茎或叶，并且没有叶绿素或其它能进行光合作用的色素。每一种生物体（叶状体）是纤维状单细胞，拥有被含有葡聚糖或几丁质或两者都含有的细胞壁包围的分支结构（菌丝体），并且含有真核。

在此所用，“病毒”指活的专性胞内寄生物，但为非细胞结构，由 DNA 或 RNA 和蛋白质外壳构成。病毒的直径范围是从大约 20 到大约 300 nm。第 I 类病毒（Baltimore 病毒分类系统）以双链 DNA 作为它们的基因组；第 II 类病毒以单链 DNA 作为它们的基因组；第 III 类病毒以双链 RNA 作为它们的基因组；第 IV 类病毒以正单链 RNA 作为它们的基因组，基因组本身起 mRNA 的作用；第 V 类病毒以负单链 RNA 作为它们的基因组，其中基因组被用作 mRNA 合成的模板；第 VI 类病毒以正单链 RNA 作为它们的基因组，但在复制中和 mRNA 合成中都有一个 DNA 中间物。多数病毒通过它们在植物、动物和原核生物中引起的疾病来识别。原核生物的病毒称为噬菌体。

在此所用，“组织”指相似细胞及它们周围的胞内物质的集合。在体内有四类基本组织：1) 上皮组织；2) 结缔组织，包括血液、骨和软骨；3) 肌肉组织；和 4) 神经组织。

在此所用，“器官”指任何能执行一定功能的身体结构，如呼吸、分泌或消化功能。

在此所用，“样品”指任何可能含有用本方法和/或试剂盒扩增的靶核酸的物质。所述样品可以是生物样品，如生物液体或生物组织。生物液体的实例包括尿、血、血浆、血清、唾液、精液、粪便、痰、脑脊液、眼泪、粘液、羊水或类似物。生物组织是细胞集合体，通常是一个特殊的种类和它们的细胞间物质，它们共同形成人、动物、植物、细菌、真菌或病毒结构包括结缔组织、上皮组织、肌肉组织和神经组织中的结构物质。生物组织的实例包括器官、瘤、淋巴节点、动脉和单个细胞。可以对生物组织加工来获得细胞悬浮液样品。该样品也可以是在体内准备的细胞的混合物。该样品也可以是培养的细胞悬浮液。如果是生物样品，那么该样品可以是天然样品或对原始样品经过各种加工或制备后获得的加工样品。例如，可以用各种细胞分离方法（如磁活性细胞分类）从体液样品如血液来分离或富集目标细胞。本发明所用样品包括富集了目标细胞的细胞制品。

在此所用，“液体（流体）样品”指自然存在的液体或流体样品，如生物学液体。“液体样品”也指自然存在的非液态样品，如固体或气体，但制备为含有固体或气体样品物质的液体、流体、溶液或悬浮液。例如，液体样品可以包括液体、流体、溶液或含生物组织的悬浮液。

在此所用，“磁性物质”指任何固有磁体特性的物质，以及通过产生、引发或制备而具有磁力特性的物质。

在此所用，“可磁化物质”指任何具有与磁场相互作用特性的物质，因此，当被自由地悬浮或放置在磁场中时，具有感应磁化并产生磁矩的特性。可磁化物质的实例包括，但不限于，顺磁物质、铁磁物质和亚铁磁物质。

在此所用，“顺磁物质”指有永久磁偶极矩的单个原子、离子或分子的物质。在不存在外部磁场时，原子偶极指向任意方向，并且在任何方向，物质作为整体没有磁化。当施加外部磁场时，原子偶极趋向于将其自己指向与磁场平行的方向，因为这种情况是比反平行位置的能量低的状态。这产生了与磁场平行的净磁化，并且对磁化系数产生了正作用。可以在多种文献中发现对“顺磁物质”或“顺磁性”的进一步详述，如由 B. I Bleaney 和 B. Bleaney, Oxford, 1975 所著的“Electricity and Magnetism”中的第六章，第 169–171 页。

在此所用，“铁磁物质”指以具有非常大的磁化系数（正）值为特征的物质，它们依赖于所施加的磁场强度。另外，甚至在不存在所施加的磁场时，铁磁物质也可以有磁矩，并且在零磁场中所保留的磁化被称为“剩磁”。可以在多种文献中发现对“铁磁物质”或“铁磁性”的进一步的详述，如由 B. I Bleaney 和 B. Bleaney, Oxford, 1975 所著的“Electricity and Magnetism”中的第六章，第 171–174 页。

在此所用，“亚铁磁物质”指表现出与普通铁磁物质类似的自发磁化、剩磁和其它特性的物质，但自发磁矩与该物质中与（磁性）偶极完全平行的分布所期望的值不相符。可以在多种文献指发现对“亚铁磁物质”或“亚铁磁性”的进一步的系数，如由 B. I Bleaney 和 B. Bleaney, Oxford, 1975 所著的“Electricity and Magnetism”中的第 16 章，第 519–524 页。。

在此所用，“金属氧化物颗粒”指任何颗粒形式的金属氧化物。某些金属氧化物具有顺磁性或超顺磁性特性。“顺磁性颗粒”的定义是，易受所使用的外部磁场的影响，但不能维持永久磁畴的颗粒。换句话说，“顺磁性颗粒”的定义也可以是，用“顺磁性物质”制成的颗粒。顺磁性物质的非限定性实例包括某些金属氧化物颗粒如  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  颗粒、金属合金颗粒如  $\text{CoTaZr}$  颗粒。

在此所用，“有毒试剂”指对人类健康有害的任何物质，如氯仿或苯酚。

在此所用，“样品，如全血、骨髓或淋巴是新鲜的”意指在大约 12 小时内从其自然来源获得或分离的样品。优选在大约 10、5、4、3、2、1 小时、30、20、10、5、2 或 1 分钟内从其自然来源获得或分离样品。

在此所用，“样品，如全血、骨髓或淋巴是低温保存的”意指将样品在大约或低于0°C的温度保存。

在此所用，“高度能水合的化合物”指可以容易地水合的任何物质，特别是有机化合物。

### B. 分离靶细胞、细胞器或病毒的方法和试剂盒

在一个方面，本发明涉及从样品中分离靶细胞、细胞器或病毒的方法，该方法包括：a) 将含有或可能含有靶细胞、细胞器或病毒的样品与磁性微珠接触，所述的磁性微珠不含有与所述的靶细胞、细胞器或病毒高特异结合的部分；b) 如果在所述的样品中存在所述的靶细胞、细胞器或病毒，使其与所述的磁性微珠非特异或低特异结合，在所述的靶细胞、细胞器或病毒和所述的磁性微珠形成复合物；c) 通过磁力从其它不需要成分中分离所述的复合物，以从所述的样品中离析所述的靶细胞、细胞器或病毒。

在另一方面，本发明涉及从样品中分离靶细胞、细胞器或病毒的试剂盒，在相同或不同的容器中该试剂盒包括：a) 用于接触含有或可能含有靶细胞、细胞器或病毒的样品的磁性微珠，所述的磁性微珠不含有与所述的靶细胞、细胞器或病毒高特异结合的部分；b) 如果在所述的样品中存在所述的靶细胞、细胞器或病毒，用于使所述的靶细胞、细胞器或病毒与所述的磁性微珠非特异或低特异结合，在所述的靶细胞、细胞器或病毒和所述的磁性微珠形成复合物的装置；c) 用于通过磁力从其它不需要成分中分离所述的复合物，以从所述的样品中离析所述的靶细胞、细胞器或病毒的装置。该试剂盒还包括使用试剂盒以从样品中分离靶细胞、细胞器或病毒的说明书。

本发明方法和试剂盒可以用于从样品中分离任何合适的靶细胞、细胞器或病毒。例举性靶细胞包括动物细胞、植物细胞、真菌细胞、细菌细胞、重组细胞和培养细胞。例举性靶细胞器包括核、线粒体、叶绿体、核糖体、ERs、高尔基器、溶酶体、蛋白酶体、分泌小体、液泡和微粒体。例举性的靶病毒包括真核细胞病毒和噬菌体。

可以用任何合适的方法来制备磁性微珠。例如，CN 01/109870. 8 或 WO02/075309 中公开的方法。可以用任何合适的可磁化物质来制备在本方法和试剂盒中有用的磁性微珠。可磁化物质的非限定性实例包括亚铁磁物质、铁磁物质、顺磁物质或超顺磁物质。在一个特定实施方案中，磁性微珠包括顺磁物质，如顺磁金属氧化物组合物。优选地，顺磁金属氧化物组合物是过渡金属氧化物或其合金。可以使用任何合

适的过渡金属，如铁、镍、铜、钴、锰、钽(Ta)、锌和锆(Zr)。在一个优选的实施方案中，金属氧化物组合物是  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  或  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ 。在另一个实施例中，在磁性微珠中所用的可磁化物质包括金属组合物。优选地，金属组合物是过渡金属组合物或其合金，如铁、镍、铜、钴、锰、钽和钽锆(CoTaZr)合金。

可以用可以得到的初级珠、原材料或用单体包封的金属氧化物来制备磁性微珠，当单体交联时会形成刚性、聚合涂层，其中如美国专利 5,834,121 中公开的。在此所用，“刚性”指聚合涂层被交联到这样的程度，即聚合涂层能稳定涂层内部的金属氧化物颗粒（即涂层基本上不会溶胀或溶解），以便颗粒保持被包封于其中的状态。在此所用，“微孔”指可以在极性有机溶剂中溶胀或膨胀的树脂聚合物基质。在此所用，“载荷”指珠子中用于官能化或衍生化作用附着位点的容量。

例如，可以被作为可磁化物质掺入的合适物质包括，氧化铁如磁铁矿、铁酸锰、铁酸钴和铁酸镍，赤铁矿和各种合金。磁铁矿是优选的金属氧化物。经常地，有人教导将金属盐转化为金属氧化物，然后或者用聚合物涂层或者被吸附到其上具有还原基团的热塑性聚合树脂的珠子中。当用金属氧化物颗粒作为原料来获得疏水初级珠时，有必要提供一种来源于乙烯基单体，优选是能用微孔基质结合或被结合的交联聚苯乙烯的热塑性聚合物刚性涂层。可以用本领域已知的方法来形成磁性颗粒，如下述文献中给出的方法：Vandenberge 等人，*J. of Magnetism and Magnetic Materials*, 15-18:1117-18 (1980); Matijevic, *Acc. Chem. Res.*, 14:22-29 (1981); 美国专利 5,091,206; 4,774,265; 4,554,088 和 4,421,660。可以在本发明中使用的初级珠的实例在下述专利中给出：美国专利 5,395,688; 5,318,797; 5,283,079; 5,232,7892; 5,091,206; 4,965,007; 4,774,265; 4,654,267; 4,490,436; 4,336,173; 和 4,421,660。或者，可以从商业上可获得的满足如下起始要求的疏水或亲水珠子来获得初级珠，这些要求为尺寸、聚合涂层在溶剂中的溶胀上具有足够稳定性以保留顺磁性颗粒、吸附或吸收用于形成网捕基质网状物的乙烯单体的能力。优选地，初级珠是疏水、聚苯乙烯包封的顺磁珠子。这样的聚苯乙烯顺磁珠子可以从以下公司获得：Dynal, Inc. (Lake Success, N.Y.)、Rhone Poulenc (France) 和 SINTEF (Trondheim, Norway)。也考虑使用具有被进一步包被来产生外部刚性聚合涂层的不稳定聚合物首次涂敷的有机调色剂颗粒或磁性颗粒。

在本方法和试剂盒中所用的磁性微珠可以有任意的合适尺寸，如直径在大约 5~大约 50,000 纳米之间。

在本方法和试剂盒中所用的磁性微珠可以未经处理或被改性，如用有机分子改性。在一个特定实施方案中，磁性微珠被改性以便包括羟基、羧基或环氧基基团。

本发明方法进一步包括冲洗分离的复合物以去除不需要的成分和/或可以进一步包括将靶细胞、细胞器或病毒从分离的复合物中回收。例如，可以用合适的缓冲液将靶细胞、细胞器或病毒从分离的复合物中释放到缓冲液中，通过磁力使磁性微珠从溶液中去除。

本发明方法和试剂盒可以用于从任何合适的样品中分离任何合适的靶细胞、细胞器或病毒。例如，本发明方法和试剂盒可以用于从临床样品中分离任何合适的靶细胞、细胞器或病毒。在另外一个例子中，本发明方法和试剂盒可以用于从血清、血浆、全血、痰、脑脊液、羊水、尿液、胃肠道内容物、头发、唾液、汗液、牙龈刮除物、骨髓、组织或细胞培养液中分离任何合适的靶细胞、细胞器或病毒。

本发明方法可以进一步包括从分离的靶细胞、细胞器或病毒中回收生物粒子。例举性的生物粒子包括氨基酸、肽、蛋白质、核苷、核苷酸、寡核苷酸、核酸、维生素、单糖、寡糖、碳水化合物、脂质及其复合物。优选地，可以从分离的靶细胞、细胞器或病毒中回收的生物粒子是寡核苷酸或核酸。本发明方法可以进一步包括扩增回收的寡核苷酸或核酸。可以使用任何合适的方法(见例如 Ausabel 等人, 编辑, Current Protocol of Molecular Biology, John Wiley 和 Sons, Inc (2000))从分离的靶细胞、细胞器或病毒中回收和/或扩增生物粒子。

本方法可以手工进行。优选地，本方法使用自动化技术来进行。本方法的任何、一些或所有步骤都可以是自动化的。例如，样品接触、结合、分离，以及任何其它额外的步骤如洗涤、靶细胞或病毒释放和生物粒子回收或扩增步骤都可以是自动化的。

本发明方法可以在任何合适的时间范围内进行。例如，本发明方法操作的时间是 1 分钟至大约 20 分钟。

本发明方法可以在任何合适的温度操作。例如，本发明方法可以在室温下进行，温度为大约 0°C 至大约 35°C。

本发明方法可以在离心管中操作。本发明方法可以在无沉淀步骤下操作。本发明方法可以在无毒性试剂存在下操作。

在一个具体的实施方案中，本发明方法用于从全血、骨髓或淋巴中分离淋巴细胞，如新鲜或低温保存的全血、骨髓或淋巴。在合适的化学环境下，淋巴细胞可以与磁性微珠接触，该环境具有以下特征：a) pH 范围为大约 3 至大约 7；和/或 b) 合适浓度或数量的抗凝剂，如右旋糖枸橼酸(ACD)、枸橼酸钠和肝素钠，如 23mM 枸橼酸，80mM 右旋糖以及 45mM 枸橼酸钠。几种例举性抗凝剂的特性见表 1 所述。

表 1 几种例举性抗凝剂的特性

剂名	抗凝力
10%草酸钾	0.2ml抗凝10ml的血
草酸钠	1~2mg抗凝1ml的血
3.8%枸橼酸钠	6mg抗凝1ml的血
双草酸盐(草酸钾、草酸胺)	0.5ml抗凝5ml的血
草酸钾	0.1ml抗凝1ml的血
氟化钠	
肝素	0.1ml抗凝5~10ml的血

本发明方法可以进一步包括用冲洗缓冲液冲洗分离的淋巴细胞-磁性微珠复合物，以去除不需要的成分。可以使用任何合适的冲洗缓冲液。例如，冲洗缓冲液可以是生理盐水，pH为大约6.5，或磷酸盐缓冲液(PBS)，pH值为大约6.5。用合适的缓冲液可以将淋巴细胞从分离的淋巴细胞-磁性微珠复合物中释放进入缓冲液中，通过磁力将磁性微珠从溶液中去除。

在另一个具体的实施方案中，本方法用于从唾液、尿液和组织培养液中分离靶细胞，如上皮脱落细胞或细菌细胞、细胞器或病毒。唾液、尿液和组织培养液可以是新鲜或低温保存的唾液、尿液和组织培养液。靶细胞、细胞器或病毒可以在pH为大约3至大约7的pH范围内的合适化学环境下与磁性微珠接触。本方法进一步包括用冲洗缓冲液冲洗靶细胞、细胞器或病毒和磁性微珠形成的复合物以去除不需要的成分。可以使用任何合适的缓冲液。例如，冲洗缓冲液可以是生理盐水，pH为大约6.5，或磷酸盐缓冲液(PBS)，pH值为大约6.5。用合适的分离缓冲液可以将靶细胞、细胞器或病毒从靶细胞、细胞器或病毒和磁性微珠的分离复合物中释放进入缓冲液中，通过磁力将磁性微珠从溶液中去除。可以使用任何合适的分离缓冲液。例如，分离缓冲液可以是pH范围为大约6.5~大约8的Tris-EDTA缓冲液和浓度为大约低于1%(w/w)的清洁剂。

### C. 用于分离病毒或噬菌体的方法和试剂盒

在另一方面，本发明涉及用于从样品中分离病毒或噬菌体的方法，该方法包括：  
 a) 从含有或可能含有靶病毒或噬菌体样品中去除细胞； b) 将所述的无细胞样品与磁性微珠接触，所述的磁性微珠不含有与所述的靶病毒或噬菌体高特异结合的部分； c) 如果在所述的样品中存在所述的靶病毒或噬菌体，使其与所述的磁性微珠非特异或低特异结合，让所述的靶病毒或噬菌体和所述的磁性微珠形成复合物； c)

通过磁力从其它不需要成分中分离所述的复合物，以从所述的样品中离析所述的靶病毒或噬菌体。

在另一方面，本发明涉及从样品中分离病毒或噬菌体的试剂盒，在相同或不同的容器中该试剂盒包括：a) 用于从含有或可能含有靶病毒或噬菌体的样品中去除细胞的装置；b) 用于与所述的无细胞样品接触的磁性微珠，所述的磁性微珠不含有与所述的靶细胞、细胞器或病毒高特异结合的部分；c) 如果在所述的无细胞样品中存在所述的靶病毒或噬菌体，用于使靶病毒或噬菌体与所述的磁性微珠非特异或低特异结合，让所述的靶病毒或噬菌体和所述的磁性微珠形成复合物的装置；c) 用于通过磁力从其它不需要成分中分离所述的复合物，以从所述的样品中分离所述的病毒或噬菌体的装置。

本发明方法和试剂盒可以用于从任何合适的样品中分离病毒或噬菌体。例举性样品包括唾液、尿液或血浆。优选地，该唾液、尿液或血浆是新鲜或低温保存的唾液、尿液或血浆。

本发明方法和试剂盒可以用于从任何合适的细胞中分离病毒或噬菌体。例举性细胞包括上皮脱落细胞和细菌细胞。该细胞可以通过任何合适的方法从样品中去除，如通过离心。

在一个具体的实施方案中，在以下物质存在下，使病毒或噬菌体与磁性微珠接触：a) 大约 10% (v/v) 至大约 100% (v/v) 浓度的高碳水化合物；和/或 b) 大约 2.5M 至大约 5.0M 浓度的盐。

任何合适的可高度水合化合物如有机化合物，可以用于本发明方法和试剂盒。例举性的可高度水合有机化合物的例子包括乙醇、丙酮和聚甘二醇。任何合适的盐可以用于本发明方法和试剂盒。例举性的盐包括氯化钠。

本方法进一步包括在用冲洗缓冲液冲洗分离的磁珠—细胞/噬菌体/病毒复合物，以去除不需要的成分。可以使用任何合适的缓冲液。例如，冲洗缓冲液可以是生理盐水，pH 为大约 6.5，或磷酸盐缓冲液 (PBS)，pH 值为大约 6.5。

本发明方法进一步包括用合适的分离缓冲液在靶病毒或噬菌体和磁性微珠之间将靶病毒或噬菌体从分离的复合物中释放进缓冲液中，通过磁力将磁性微珠从溶液中去除。

上述 B 部分提到的 如靶细胞、样品、磁性微珠的特性、冲洗和分离缓冲液及步骤、被释放的生物粒子、在各种操作中的自动化、时间、温度和分离中的各个方面，不去考虑某些步骤或物质等等，均可以用于 C 部分。

#### D. 例举性实施方案

本文描述的实施方案涉及使用磁性微珠的非特异或低特异吸附和顺磁性从全血、唾液、血浆、骨髓、唾液、尿液和细胞和组织培养液分离细胞和含靶生物分子（如核酸和蛋白）的生物粒子（如淋巴细胞、病毒、上皮细胞和培养细胞）。在合适的缓冲液下，磁性微珠可以从磁珠—细胞/噬菌体/病毒复合物中分离出来。分离的细胞可以用于细胞培养、药物筛选、生物化学反应和生物分析。

这些实施方案的重要方面是使用磁性微珠与有核细胞的顺磁、高分散性和黏附性。它们可以非特异或低特异吸附生物粒子，由于化学试剂的沉淀作用将生物粒子从样品中拉出来。可以在不同规模的样品制备中使用该简单迅速的分离方法，特别是少量和微量样品，并且很容易地建立自动和微型化装置。

### 1. 淋巴细胞从全血中的非特异吸附和分离

传统的淋巴细胞从全血中的分离技术经常包括：（1）密度梯度离心；（2）首先用化学试剂破碎红细胞，然后通过离心提取淋巴细胞；（3）与淋巴细胞表面抗原结合的特异抗体的衍生固体材料的亲合色谱法。但是这些方法费用昂贵，并且难于实行自动化和微观化。

在该实施方案中，用有机材料包被的磁性微珠可以在合适的化学和物理条件下非特异和有效地吸附淋巴细胞。因此该操作是简单和迅速的，不需要离心和升高温度仅需几分钟可将淋巴细胞从全血中完全分离。因此能容易地建立自动微量分离装置。

#### 1.1 固体载体的制备

可以通过任何合适的方法制备包被的磁性微珠，如在 CN01/109870.8 或 WO02/075309 中公开的方法。制备方法和磁性微珠的直径会明显影响提取淋巴细胞。但是用羟基、羧基和环氧基改性的磁性微珠具有更好的分离效果。没有必要用其它化学处理方法处理磁性微珠。

#### 1.2 操作步骤

- (1) 在全血样品中加入小磁性微珠（在 Tris-EDTA 缓冲液中悬浮, pH6.0）。将混合物通过涡旋混合器轻轻搅拌，在室温下孵育 3 分钟。
- (2) 通过磁场分离磁性微珠-淋巴细胞复合物，弃去上清。
- (3) 用 70% 乙醇溶液冲洗磁性微珠-淋巴细胞复合物两次或用 PBS 缓冲液冲洗一次。
- (4) 将一些分离缓冲液加入到复合物中，将混合物在室温下孵育 10 分钟。收集洗提液，淋巴细胞可以用于相关分析。

### 1.3 化学试剂含量

分离缓冲液: TE (pH7.0) : 10mMEDTA/25mMTris-HCl; Tween20:0.1%。

### 1.4 主要优点

该方法具有一些主要优点: (1) 操作简单快速, 仅需 1-3 分钟; (2) 仅需一个离心管, 不需要沉淀; (3) 获得的产物适于随后的生物操作; (4) 容易实行自动操作; (5) 不使用毒性试剂, 操作安全; (6) 在室温下操作; (7) 磁性微珠容易保存, 它对分离效果没有明显影响。

### 2. 从唾液、血浆、尿液和细胞培养非特异吸附和分离靶细胞

#### 2.1. 操作步骤

(1) 在生物样品中加入磁性微珠(在 Tris-EDTA 缓冲液中悬浮, pH6.0)。将混合物通过涡旋混合器轻轻搅拌, 在室温下孵育 3 分钟。

(2) 通过磁场分离磁性微珠-细胞复合物, 弃去上清。

(3) 用 70% 乙醇溶液或 PBS 缓冲液冲洗磁性微珠-细胞复合物两次。

(4) 将一些分离缓冲液加入到复合物中, 在室温下孵育 10 分钟。收集洗提液, 细胞可以用于相关分析。

#### 2.2. 化学试剂含量

分离缓冲液: Tris-EDTA (pH7.0) : 10mMEDTA/ 25mMTris-HCl; Tween 20:0.1%。

#### 2.3. 主要优点

该方法具有一些主要优点: (1) 操作简单快速, 仅需 20 分钟; (2) 仅需一个离心管, 不需要沉淀; (3) 获得的产物适于随后的生物操作; (4) 容易实行自动操作; (5) 不使用毒性试剂, 安全操作; (6) 在室温下操作; (7) 磁性微珠容易保存, 它对分离效果没有明显影响。

### 3. 从唾液、血浆、尿液和细胞培养中非特异吸附分离靶病毒和噬菌体

#### 3.1. 分离步骤

(1) 在生物样品中加入磁性微珠(在 Tris-EDTA 缓冲液中悬浮, pH 6.0 )和样品的 0.2 倍体积的吸附缓冲液。将混合物通过涡旋混合器轻轻搅拌, 在室温下孵育 3 分钟。

(2) 通过磁场分离磁性微珠-细胞复合物, 弃去上清。

(3) 用 70% 乙醇溶液或 PBS 缓冲液冲洗磁性微珠-细胞复合物两次。

(4) 将一些分离缓冲液加入到复合物中, 在室温下孵育 10 分钟。收集洗提液, 病毒或噬菌体可以用于相关分析。

### 3.2. 化学试剂含量

- (1) 吸附缓冲液 NaCl2. 5M, PEG20% (W/V)。
- (2) 分离缓冲液 TE (pH7. 0) : 10mMEDTA/25mMTris-HCl; Tween 20:0. 1%。

### 3.3. 主要优点

该方法具有一些主要优点：（1）操作简单快速，仅需大约 20 分钟；（2）仅需一个离心管，不需要沉淀；（3）获得的产物适于随后的生物操作；（4）容易实行自动操作；（5）不使用毒性试剂，安全操作；（6）在室温下操作；（7）磁性微珠容易保存，它对分离效果没有明显影响。

## E. 实施例

### 实施例 1. 使用磁性微珠从人全血中分离淋巴细胞

用 ACD 对人健康供血者的全血抗凝。淋巴细胞的分离步骤如下：在含有  $30 \mu L$  悬浮在 Tris-EDTA 缓冲液 (pH6. 0) 的  $15 \mu g / \mu L$  的磁性微珠的  $1.5mL$  的离心管中加入  $300 \mu L$  经抗凝的血液。通过涡旋混合器轻轻搅拌混合物 15 秒，在室温下孵育 3 分钟。磁性微珠-淋巴细胞复合物就固定在外磁场上，弃去上清。用  $100 \mu L$  70% 乙醇溶液冲洗磁性微珠-DNA 复合物两次。如果保留淋巴细胞的完整结构，那么就使用 PBS 缓冲液 (pH7. 4) 代替乙醇冲洗微珠。在室温下乙醇完全蒸发后， $50 \mu L$  Tris-EDTA-Tween20 ( $pH7. 0, 10mmol \cdot L^{-1}$  Tris-HCl,  $1mmol \cdot L^{-1}$  EDTA and Tween20:0. 1%) 溶液加入到复合物中，在室温下孵育 10 分钟，洗脱淋巴细胞。通过外磁场分离磁性微珠。收集洗脱物，获得的淋巴细胞可以用于提取大的生物分子（如核酸和蛋白）。整个过程仅花费 15 分钟。

不同直径、不同方法包被的磁性微珠可以用于分离淋巴细胞。包被的磁性微珠与未处理的磁性微珠比较发现直径为  $200nm$  的磁性微珠的分离效果最好，在 pH 为 5.5 时的分离效率为 75%。使用直径在  $20\sim100nm$  的磁性微珠的分离效率有很小的差异，大约为 50%。使用直径超过  $300nm$  的微珠的分离效率为大约 30%。在改性以后，磁性微珠的分离效率增加了 15~30%。

### 实施例 2. 使用磁性微珠从细胞培养中分离大肠杆菌以及提取基因组 DNA

样品是培养过夜的不含有质粒的大肠杆菌。步骤如下：在含有  $50 \mu L$  的  $15 \mu g / \mu L$  悬浮在 Tris-EDTA 缓冲液 (pH6. 0) 中的磁性微珠的  $1.5mL$  的离心管中加入  $300 \mu L$  细胞培养物。将混合物用涡旋混合器轻轻搅拌 15 秒，在室温下孵育 3 分钟。然后将微珠-细胞复合物固定在外磁场上，弃去上清液。细胞被选择性吸附在微珠的表面上。

将 300  $\mu$  L 细胞溶解液 (NaI 11.25g; Urea 12.0g; Triton X-100 0.65ml; TE (pH 8.0) 30ml: 10mMEDTA/25mMTris-HCl) 加入到混合物中，通过涡旋混合器将悬液混合均匀，在室温下孵育 5 分钟以溶解淋巴细胞。300  $\mu$  L 异丙醇加入到混合物中，将悬液用涡旋混合器混合均匀，静置 5 分钟。然后将微珠-DNA 复合物固定在外磁场上，弃去上清液。用 70% 乙醇液冲洗微珠-DNA 复合物两次。在室温下乙醇完全蒸发后，将 100  $\mu$  L 的 Tris-EDTA (pH 6.0) 液加入到复合物中，在室温下孵育 10 分钟以洗脱 DNA。然后将磁性微珠固定在磁性平台上。收集洗提物，通过凝胶电泳和紫外分光仪进行直接分析。DNA 的产量是 30  $\mu$  g/ml。使用 SDS 和蛋白酶酚/氯仿方法比较破碎细胞，微珠方法提取的基因组 DNA 产量低但纯度相同。

#### 实施例 3. 从唾液中分离上皮细胞

唾液由健康受试者提供。步骤如下：在含有 30  $\mu$  L 的 15  $\mu$  g/ $\mu$  L 悬浮在 Tris-EDTA 缓冲液 (pH 6.0) 中的磁性微珠的 1.5mL 的离心管中加入 300  $\mu$  L 细胞培养物。将混合物用涡旋混合器轻轻搅拌 15 秒，在室温下孵育 3 分钟。然后将微珠-细胞复合物通过外磁场固定在管壁上，弃去上清液。细胞被选择性吸附在微珠的表面上。

用 100  $\mu$  L 70% 乙醇溶液冲洗磁性微珠-细胞复合物两次。如果要保持上皮细胞的完整结构，用 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 代替乙醇冲洗微珠。在室温下乙醇完全蒸发后，在复合物中加入 50  $\mu$  L Tris-EDTA-Tween20 液 (pH 7.0, 10mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 1mmol·L<sup>-1</sup> EDTA 和 Tween20: 0.1%)，在室温下孵育 10 分钟以洗脱上皮细胞。然后通过外磁场分离磁性微珠。收集洗提物，将获得的上皮细胞用于提取大的生物分子（如核酸和蛋白），整个过程仅需 15 分钟。分离效率等于用离心方法分离的 60%。

该方法快速、有效地用于从唾液中分离上皮细胞，该方法不使用有毒试剂因而是安全的。该方法产生了含有上皮细胞和磁性微珠-上皮细胞复合物的洗提物，它可以在 PCR 反应系统中直接用作模板以扩增 HLA 基因。通过凝胶电泳分析扩增产物。该实验建立了快速有效的基于微球体的 PCR 方法以扩增 HLA 基因。它比传统的方法更快也更简单。模板的制备仅需大约 10 分钟，减少了 PCR 抑制剂的使用，并且没有特异的扩增。

#### 实施例 4. 从细胞培养分离噬菌体

步骤如下：将 300  $\mu$  L 含有 M13 噬菌体的肉汤肉汁培养基 2xTY 离心 5 分钟。将上清液加入到含有 30  $\mu$  L 的 15  $\mu$  g/ $\mu$  L 悬浮在 Tris-EDTA 缓冲液 (pH 6.0) 中、直径为 200nm 的磁性微珠的 1.5mL 的离心管中。然后在混合物中加入 0.2 倍混合物体积

的 20% 的聚乙二醇 (NaCl:2. 5M)。将混合物用涡旋混合器轻轻搅拌 15 秒，在室温下孵育 3 分钟。然后将微珠-噬菌体复合物通过外磁场固定在管壁上，弃去上清液。

用  $100 \mu L$  70% 乙醇溶液冲洗磁性微珠-细胞复合物两次。如果要保持噬菌体的完整结构，用 PBS 缓冲液 (pH7. 4) 代替乙醇冲洗微珠。在室温下乙醇完全蒸发后，在复合物中加入  $50 \mu L$  Tris-EDTA-Tween20 液 (pH7. 0,

$10 \text{mmol. L}^{-1}$  Tris-HCl,  $1 \text{mmol. L}^{-1}$  EDTA 和 Tween20:0. 1%)，在室温下孵育 10 分钟以洗脱噬菌体。然后通过外磁场分离磁性微珠。收集洗提物，将获得的噬菌体用于提取大的生物分子（如核酸和蛋白）。整个过程仅需 15 分钟。分离效率等于用离心方法分离的 70%。

#### 实施例 5. 从血浆中分离感冒病毒

步骤如下：将  $300 \mu L$  血浆与流感杆菌混合。将混合物加入到含有  $30 \mu L$  的  $15 \mu g / \mu L$  悬浮在 Tris-EDTA 缓冲液 (pH6. 0) 中、直径为 200nm 的磁性微珠的  $1.5 mL$  的离心管中。然后在混合物中加入 0.2 倍混合物体积的 20% 的聚乙二醇 (NaCl:2. 5M)。将混合物用涡旋混合器轻轻搅拌 15 秒，在室温下孵育 3 分钟。然后将微珠-噬菌体复合物通过外磁场固定在管壁上，弃去上清液。

用  $100 \mu L$  70% 乙醇溶液冲洗磁性微珠-细胞复合物两次。如果要保持噬菌体的完整结构，用 PBS 缓冲液 (pH7. 4) 代替乙醇冲洗微珠。在室温下乙醇完全蒸发后，在复合物中加入  $50 \mu L$  Tris-EDTA-Tween20 液 (pH7. 0,

$10 \text{mmol. L}^{-1}$  Tris-HCl,  $1 \text{mmol. L}^{-1}$  EDTA 和 Tween20:0. 1%)，在室温下孵育 10 分钟以洗脱病毒。然后通过外磁场分离磁性微珠。收集洗提物，将获得的病毒用于提取大的生物分子（如核酸和蛋白）。整个过程仅需 15 分钟。分离效率等于用离心方法分离的 50%。

上述包含的实施例仅仅用于阐明的目的，无意限制本发明的范围。对上述描述的许多变化是可以的。由于对上述实施例的修改和变化对本领域普通技术人员来说是显而易见的，因此，本发明仅通过所附的权利要求限制范围。

说 明 书 附 图

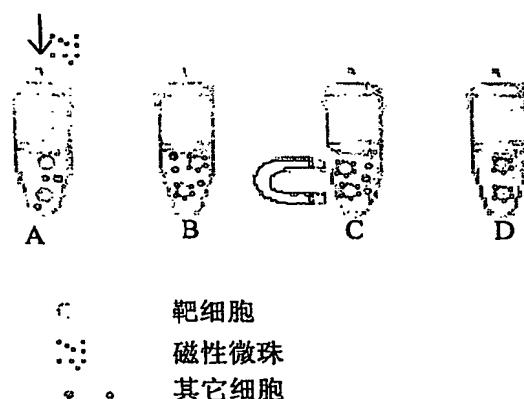


图 1

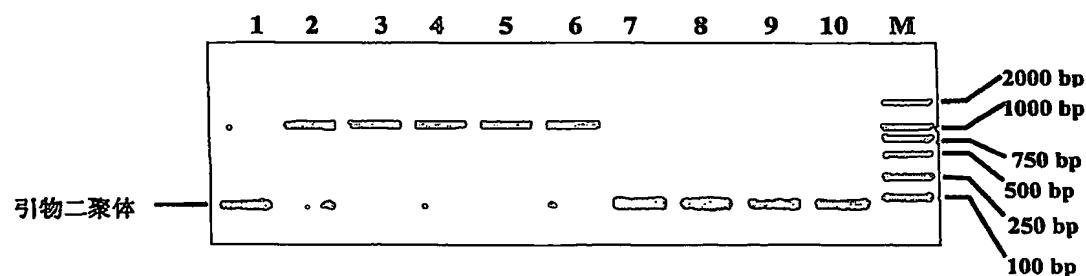


图 2